

研究用試薬

2018年4月2日改訂

この度は弊社製品をご購入いただきましてありがとうございます。ご使用に際してはキットに同梱された取扱説明書に従って測定を実施してください。なお、操作法は弊社 Web サイト[良い結果を出すためのポイント（動画）]、並びに[Q&A]をご参照ください。また、本キットを初めてご使用になられる場合は後述の「◆ご使用前にご確認頂きたい技術上のヒント及び注意事項」をご確認の上ご使用ください。

『 レビス® Human VEGF ELISA Kit 』 取扱説明書

1. イントロダクション

VEGF ファミリーは血管新生において重要な役割を担うサイトカインで、異なる遺伝子にコードされる VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PLGF-1 及び PLGF-2 の 7 種類が知られています。なかでも、VEGF-A は最も強力な作用を示し、選択的スプライシングにより 121,165,189 アミノ酸タイプのサブタイプが存在することが知られています。VEGF-A₁₆₅ はサブタイプの中で、最も多く存在し、腫瘍血管を誘導する効率も高いことが知られており、種々の癌において、予後の悪化と強く関係することが示されています。また、関節リウマチ、動脈硬化、網膜症、POEMS 症候群などの疾患との相関も報告されています。

本キットはヒト VEGF(VEGF-A₁₆₅)を定量的に測定するためのサンドイッチ酵素免疫測定法試薬で、ヒト血清（血漿）中の VEGF を特異的かつ高感度で測定することができます。また、本キットに含まれる標準品は大腸菌リコンビナントタンパク質であり、カルタヘナ法非該当品です。本キットは研究目的にのみご使用ください。

◆製品の特長

- ヒト血清（血漿）中 VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF-A₁₆₅)を特異的かつ高感度で測定できます。
- 全反応時間は 4 時間 50 分です。
- 標準品は大腸菌リコンビナントで、カルタヘナ法非該当です。

2. 測定原理

本キットは標準品、検体を抗 VEGF 抗体固相化マイクロプレートウェル中でインキュベートします。2 時間のインキュベーションと洗浄後、ビオチン結合抗 VEGF 抗体を加え 2 時間インキュベートします。再度の洗浄後、ペルオキシダーゼ・アビジン結合物を加え、30 分インキュベートします。洗浄後、ウェルに残ったペルオキシダーゼを発色液(TMB)と反応させます。反応は酸性の溶液の添加で停止され、反応の結果生じた黄色の産物が 450 nm（副波長 620 nm）で比色測定されます。吸光度は VEGF 濃度にほぼ比例します。標準品濃度に対して吸光度をプロットすることで検量線が作られ、この検量線を使って未知検体中の濃度が決定されます。

3. 構成

構 成 品	状 態	容 量
(A) 抗体固相化 96 ウェルプレート	洗浄後使用	96 wells(8×12)/1 枚
(B) ヒト VEGF 標準品(1 µg)	凍結乾燥品・溶解後使用	1 本
(C) 緩衝液	そのまま使用	60 mL/1 本
(D) ビオチン結合抗 VEGF 抗体	凍結乾燥品・溶解後使用	1 本
(E) ペルオキシダーゼ・アビジン結合物	希釈後使用	100 µL/1 本
(F) 発色液(TMB)	そのまま使用	12 mL/1 本
(H) 反応停止液(1 M H ₂ SO ₄) ※取扱注意	そのまま使用	12 mL/1 本
(I) 濃縮洗浄液(10×)	希釈後使用	100 mL/1 本
プレートシール		4 枚
取扱説明書		1 部

4. キットの保存と使用期限

キットは 2℃～8℃で保存してください（凍結厳禁）。この保存条件下でキットは製造月から 12 ヶ月（外箱のラベルに記載）までは安定です。有効期限の過ぎた試薬は使用しないでください。開封した各試薬につ

きましては、保管状態により影響を受ける可能性がありますので早めのご使用を推奨します。

5.キット以外に測定に必要な器具 □チェックリスト

□精製水（蒸留水） □試験管 □洗浄液希釈用器具 □チップ交換型ピペット（50 µL 及び 100 µL～1000 µL を正確に採取できるもの） □連続分注ピペット □ペーパータオル等（洗浄時に使用） □攪拌器（Vortex タイプ） □プレート振とう器（約 600 rpm～1200 rpm） □プレート用洗浄機（あれば好ましい）または噴射ビン □プレートリーダー（450 ± 10 nm/600 nm～650 nm） □データ計算用ソフトウェア

6.試薬の調製

- *キットの試薬は使用前に必ず室温(20 °C～25 °C)に戻してください（2 時間位が目安です）。
- *3.で「そのまま使用」とある試薬は室温化後そのままの状態で使用できます。「溶解後使用」、「希釈後使用」とあるものについては下記の要領で調製してください。
- *測定に必要な分だけ試薬を調製してください。

【濃縮された試薬類の希釈】

(B)ヒト VEGF 標準品(1 µg)；検量線作成用

(B)ヒト VEGF 標準品(1 µg)に精製水 1 mL を加え溶解（標準品原液）し、その後室温化されたキット添付 (C)緩衝液で調製してください。下記は一例です。

標準溶液の容量	緩衝液	濃度(pg/mL)
標準品原液： 50 µL	575 µL	80000
80000 pg/mL 溶液： 50 µL	450 µL	8000
8000 pg/mL 溶液： 50 µL	450 µL	800
800 pg/mL 溶液： 200 µL	400 µL	267
267 pg/mL 溶液： 200 µL	400 µL	88.9
88.9 pg/mL 溶液： 200 µL	400 µL	29.6
29.6 pg/mL 溶液： 200 µL	400 µL	9.88
9.88 pg/mL 溶液： 200 µL	400 µL	3.29
3.29 pg/mL 溶液： 200 µL	400 µL	1.10
0 (Blank)	400 µL	0.00

検量線作成

(D)ビオチン結合抗 VEGF 抗体

精製水 250 µL を加え溶解し、(C)緩衝液で 100 倍に希釈してください。

(E)ペルオキシダーゼ・アビジン結合物

(C)緩衝液で 100 倍に希釈してください。

(I)濃縮洗浄液(10×)

濃縮洗浄液(10×)を室温化された精製水（蒸留水）で 10 倍に希釈してください。

例：100 mL の濃縮洗浄液(10×)+900 mL の精製水（蒸留水）（96 ウェル全てを使用する場合）

【各試薬の安定性と保存方法】

(A)抗体固相化 96 ウェルプレート

未使用抗体固相化ストリップはジップシールパックに戻し、そのまま 2 °C～8 °C で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(B)ヒト VEGF 標準品(1 µg)

有効期限内安定性を保ちます。標準品原液は 2 °C～8 °C で保存し、2 週間以内に使用してください。

希釈調製した各標準溶液は直ちに使用し、保存はしないでください。

(C)緩衝液及び(F)発色液(TMB)

一部の溶液を使用する際は必要量より少し多めの量を別の容器に移し、残りは室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2 °C～8 °C で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(D)ビオチン結合抗 VEGF 抗体及び(E)ペルオキシダーゼ・アビジン結合物

キットを分割して使用する際は希釈時に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2 °C～8 °C で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み液は廃棄してください。

(H)反応停止液(1 M H₂SO₄)

使用残りを保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2 °C～8 °C で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(I)濃縮洗浄液(10×)

濃縮洗浄液(10×)を保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2℃～8℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み洗浄液は廃棄してください。

7.検体の調製

- 検体を長期に保管する場合は、-35℃以下での凍結保管を推奨します。繰り返しの凍結融解は避けてください。凍結した検体は測定する直前に解凍し十分に攪拌してください。また、検体を希釈する場合は用時調製としてください。
- 検体は定法に従い採血、分離したヒト血清及び血漿を使用してください。
- 血漿採血時の抗凝固剤には、EDTA（又はヘパリン）を使用してください。
- 血清分離促進剤等を使用する際は事前確認をしてください。
- 溶血した検体や高脂質検体は使わないでください。
- 濁り及び不溶物のある検体は遠心分離等で除去後測定に用いてください。
- 妨害物質の影響が疑わしい検体は、同一検体において、異なる2ポイント以上の希釈率で希釈直線性を確認してください。
- 検体を希釈する場合は、あらかじめ試験管(PP、PE)等を用いて緩衝液で希釈し測定ウェルに分注してください。

8.測定操作法

洗浄操作を始める前に次に分注する試薬を前もって用意してください。

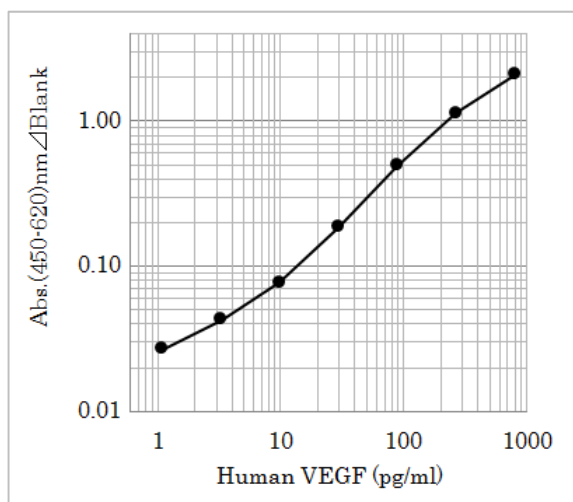
- (1) あらかじめ調製した洗浄液を各ウェルに満たし、4回洗浄(*①)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
 - (2) 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を100μLずつ分注します。
 - (3) 検体測定ウェルに検体を100μLずつ分注します。
 - (4) マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌(*②)します。
 - (5) プレートシールを貼り(*③)、室温(20～25℃)で2時間静置します。
 - (6) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし、4回洗浄(*①)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
 - (7) 各ウェルにビオチン結合抗 VEGF 抗体を100μLずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌(*②)します。
 - (8) プレートシールを貼り(*③)、室温(20℃～25℃)で2時間静置します。
 - (9) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし4回洗浄(*①)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
 - (10) 各ウェルにペルオキシダーゼ・アビジン結合物を100μLずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌(*②)します。
 - (11) プレートシールを貼り(*③)、室温(20℃～25℃)で30分間静置します。
 - (12) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし4回洗浄(*①)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
 - (13) 各ウェルに発色液を100μLずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌(*②)します。
 - (14) プレートシールを貼り(*③)、室温(20℃～25℃)で20分間静置します。
 - (15) 各ウェルに反応停止液を100μLずつ分注し、発色反応を停止します。
 - (16) 攪拌(*②)後マイクロプレート用分光光度計で450nm（副波長620nm）での吸光度を測定します。副波長は600nm～650nmの範囲で使用できます。
- (*①)、(*②)、(*③) 測定手順概要（6、7ページ）をご参照ください。

9.計算

- (1)測定毎に検量線を作成します。X軸を標準溶液濃度(pg/mL)、Y軸を吸光度の検量線グラフを作成してください。
 - (2)検量線より、(希釈) 検体の吸光度に対応する濃度(pg/mL)を読み取ります。読み取った濃度に検体希釈率を乗じ測定値とします。
- * 検体の吸光度が検量線吸光度より外れた場合は(C)緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定を実施してください。
- * 演算処理では、3次多項式または4または5パラメーターの使用をお勧め致します。

10.キャリブレーション

本キットによって得られた測定値は、下記計算式に従ってキット添付の別紙に定められた換算係数を乗じることでNIBSC/WHO 標準品 VEGF165(Code:02/286)を基準にしたユニット濃度に換算することができます。



レビス® Human VEGF ELISA Kit (AKH-VEGF)

NIBSC/WHO(02/286)ユニット濃度(U/mL) = 換算係数 × 本キット測定値(pg/mL)

* 換算係数は製品ロットごとに変動する場合がありますので、製品ロットごとに定められた換算係数を確認してから計算してください。

11. キットの性能

●測定範囲：1.10 pg/mL～800 pg/mL

●精度試験（アッセイ内変動）

正常血清に異なる濃度の VEGF を添加した 2 検体を 5 重測定

n / ID	Sample1 (pg/mL)	Sample2 (pg/mL)
1	29.7	37.8
2	28.3	36.5
3	27.7	35.0
4	29.3	35.4
5	28.8	35.4
mean	28.8	36.0
SD	0.79	1.1
CV(%)	2.8	3.2

平均 C.V. 値は 15 % 未満

●再現性試験（アッセイ間変動）

正常血清に異なる濃度の VEGF を添加した 3 検体を 4 日間、3 重測定

Day / ID	Sample1 (pg/mL)	Sample2 (pg/mL)	Sample3 (pg/mL)
0 日目	279	86.1	11.9
1 日目	271	84.5	12.5
2 日目	268	88.5	11.2
3 日目	269	88.1	11.5
mean	272	86.8	11.8
SD	5.0	1.9	0.56
CV(%)	1.8	2.1	4.8

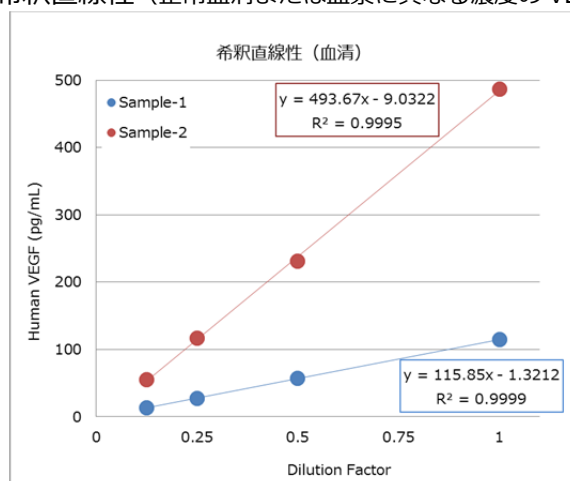
平均 C.V. 値は 15 % 未満

●添加回収試験（正常血清または血漿検体に異なる 3 濃度の VEGF を添加し測定） 回収率は 94.3～106 %

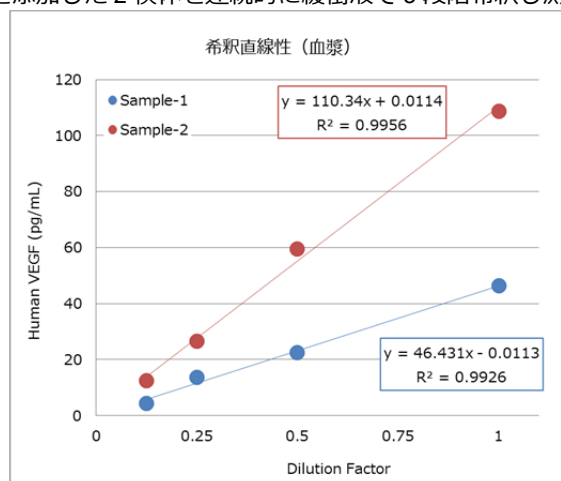
添加量 (pg/mL)	実測値 (pg/mL)	回収量 (pg/mL)	回収率 (%)
0	50.6		
89.0	145	94.4	106
189	237	186	98.4
388	456	405	104

添加量 (pg/mL)	実測値 (pg/mL)	回収量 (pg/mL)	回収率 (%)
0	42.1		
97.5	134	91.9	94.3
197	240	198	100
396	420	378	95.5

●希釈直線性（正常血清または血漿に異なる濃度の VEGF を添加した 2 検体を連続的に緩衝液で 3 段階希釈し測定）



直線回帰の r^2 は 0.99 以上



12. トラブルシューティングと Q&A

●すべてのウェルでの反応が弱い

原因として考えられること

- 1) 標準品や検体の入れ忘れ。
- 2) 発色に関連する試薬溶液の入れ忘れ。
- 3) 発色に関連する試薬溶液の取り違いや希釈調製不良。
- 4) 酵素阻害剤の混入。
- 5) キット保管温度の影響（凍結した場合）。

レビス® Human VEGF ELISA Kit (AKH-VEGF)

- 6) プレートの過剰な洗浄。
- 7) 発色液の温度が低かった。
- 最小標準溶液濃度(1.10 pg/mL)の OD 値よりブランク OD 値が高くなる。
原因として考えられること
洗浄が不適当、不完全であった。
- 変動係数(CV)が大きい
原因として考えられること
 - 1) 洗浄が不適当、不完全であった。
 - 2) 標準品や管理血清、検体の攪拌が不十分であった（凍結検体の攪拌は充分に行ってください）。
 - 3) ピペッティング操作が一定ではなかった。
- Q-1：キットは分割して使用することができますか？
A-1：できます。使用しないプレートはジップシールパックに戻し、冷蔵庫に保管してください。
- Q-2：プレートを取り出したらウェルの中に保存液が入っていませんでしたが問題ありませんか？
A-2：問題ありません。このキットは乾燥プレートタイプとなっております。
- Q-3：検体を融かしたらモヤモヤした不溶解物がありましたが測定に影響がありますか？
A-3：影響が出る可能性があります。測定値が低く出たり、測定下限以下になる場合があります。
- Q-4：血漿でも測定できますか？
A-4：血漿でも測定できますが、社内においては血漿での測定は血清に比べ低く出る傾向が見られました。採血条件は統一されることをお勧めします。

ワークシート (例)

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	Std. 800 pg/mL	検体 1	検体 9	検体 17	検体 25	検体 33
B	Std. 267 pg/mL	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
C	Std. 88.9 pg/mL	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
D	Std. 29.6 pg/mL	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
E	Std. 9.88 pg/mL	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
F	Std. 3.29 pg/mL	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
G	Std. 1.10 pg/mL	検体 7	検体 15	検体 23	検体 31	検体 39
H	0	検体 8	検体 16	検体 24	検体 32	検体 40

◆ご使用前にご確認頂きたい技術上のヒント及び注意事項

- ELISA 法は測定環境により影響を受けます。測定操作、静置反応場所の室温：20℃～25℃（実験台上またはインキュベータ内温度）を厳守してください。また、風速（エアコン風も含む）：0.4 m/sec 以上、湿度 30 %未満の環境下での測定は避けてください。
静置反応場所については、弊社 Web サイトの動画「反応条件」でご確認ください。
- 各ステップでの静置反応時には、ウェルの乾燥、異物の混入、温度の偏り、分注試薬の蒸発を防止する為、必ずプレートシールを貼ってください。
- 検体と試薬に不純物が混ざらないように気をつけてください。1 ウェル／1 チップのご使用をお勧めします。
- 発色液は使用するまでは薄い黄色澄明です。光を避けて保存してください。
- 反応停止液は 1M の硫酸です。取り扱いに注意してください。使用するまでは無色です。
- 本キットは ELISA 法の研修を終了した方、または指導者の方でご使用ください。用手法操作で測定する際にはピペッティング操作の再現性が安定した方がご使用ください。
- 準備並びに本キット操作中は手袋、眼鏡、保護用着衣を身につけてください。
- 試薬類を皮膚に付けないでください。本キットの試薬が誤って、目、口、傷口、皮膚等に付着した場合は直ちに水道水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要場合は医師の手当てを受けてください。
- 本キットを使用している場所では飲食や喫煙をしないでください。
- 試薬類は口でピペッティングしないでください。
- ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないでください。
- 検体は感染の危険性があるものとして充分注意して取り扱ってください。本キットは動物由来の成分を含んでいます。
- 使用済みの検体、使用した消耗品等は、定法に従い滅菌処理してください。処理した検体や消耗品、未使用の薬品類は所属施設の規定並びに各地域の法令に従って廃棄してください。

【測定手順概要とチェックリスト】

必ず取扱説明書を一読して検体条件、測定条件、測定方法を確認後測定操作を行ってください。

- ☐ プレート、試薬類を十分に室温(20℃～25℃)に戻してください。室温化には2時間位必要です。
- ☐ 濃縮洗浄液の希釈：室温化された精製水で、**10倍**に希釈してください。
標準溶液の希釈(例)：
(B)ヒト VEGF 標準品(1 µg)に精製水 1 mL を加え溶解(標準品原液)し、その後室温化されたキット添付(C)緩衝液で調製してください。下記は一例です。

	標準溶液の容量	緩衝液	濃度(pg/mL)
	標準品原液：50 µL	575 µL	80000
	80000 pg/mL 溶液 50 µL	450 µL	8000

希釈例	濃度(pg/mL)	800	267	88.9	29.6	9.88	3.29	1.10
	標準溶液(µL)	50	200*	200*	200*	200*	200*	200
	緩衝液(µL)	450	400	400	400	400	400	400

*：ひとつ高濃度の標準溶液

各操作注意事項

☐	抗体固相化 96 ウェルプレート		
☐	↓洗浄 4 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注)		* ①
☐	検体または標準溶液	100 µL	* ④
☐	↓攪拌、室温(20℃～25℃)、2 時間反応、静置		* ② * ③
☐	(D)ビオチン結合抗 VEGF 抗体の希釈。精製水で溶解後、室温化した緩衝液で 100 倍 に希釈してください。希釈溶液の調製は第一反応中に行う。		
☐	↓洗浄 4 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注)		* ①
☐	ビオチン結合抗 VEGF 抗体	100 µL	* ④
☐	↓攪拌、室温(20℃～25℃)、2 時間反応、静置		* ② * ③
☐	(E)ペルオキシダーゼ・アビジン結合物の希釈。室温化した緩衝液で 100 倍 に希釈してください。希釈溶液の調製は第二反応中に行う。		
☐	↓洗浄 4 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注)		* ①
☐	ペルオキシダーゼ・アビジン結合物	100 µL	* ④
☐	↓攪拌、室温(20℃～25℃)、30 分間反応、静置		* ② * ③
☐	↓洗浄 4 回 (洗浄液除去後、直ちに発色液分注)		* ①
☐	発色液(TMB) TMB が室温化されていることを確認分注後、濃度により青色に呈色	100 µL	* ④
☐	↓攪拌、室温(20℃～25℃)、20 分間反応、静置		* ② * ③
☐	反応停止液(1 M H ₂ SO ₄) 強酸性につき取扱注意分注後、濃度により黄褐色に変色	100 µL	* ④
☐	↓攪拌 (直ちに攪拌)		* ②
☐	吸光度測定 (主波長 450 nm、副波長 620 nm:600 nm～650 nm) 副波長はプレート裏面の汚れ等をキャンセルします		

(*) ① 洗浄毎に洗浄液をウェルに分注後、手のひらの上で 10 秒ほど軽く振り廃棄します。4 回連続洗浄後、ペーパータオル上にプレートを逆さにして叩き洗浄液を完全に除去します。洗浄液除去後の乾燥に注意して次の溶液を直ちに分注します。洗浄液をピペットで添加する際の液量目安は 300 µL/ウェルです。万一、最小標準溶液濃度(1.10 pg/mL)の OD 値よりブランク OD 値が高くなる場合は解決方法の 1 つとして、ペルオキシダーゼ結合物と反応後の洗浄回数 4 回を同じ流速で 5 回～6 回に増やしてください。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安は 5 mL/分～25 mL/分 (ノズルの径により異なります)

レビス® Human VEGF ELISA Kit (AKH-VEGF)

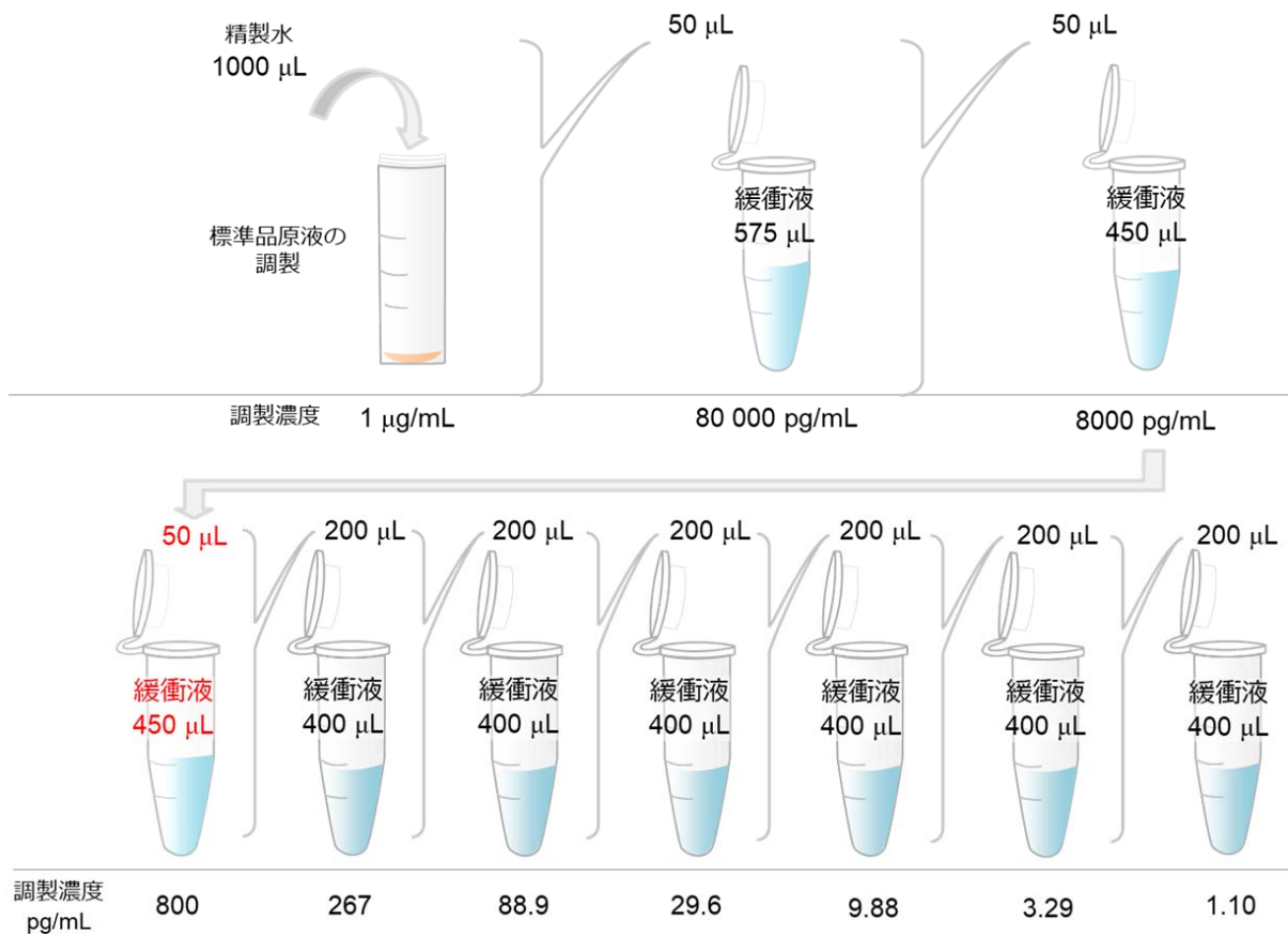
す) です。第一反応後の初回の洗浄のみウェル間のコンタミに注意してください。

(* ②) 攪拌の目安は 600 rpm ~ 1200 rpm - 10 秒間、3 回。

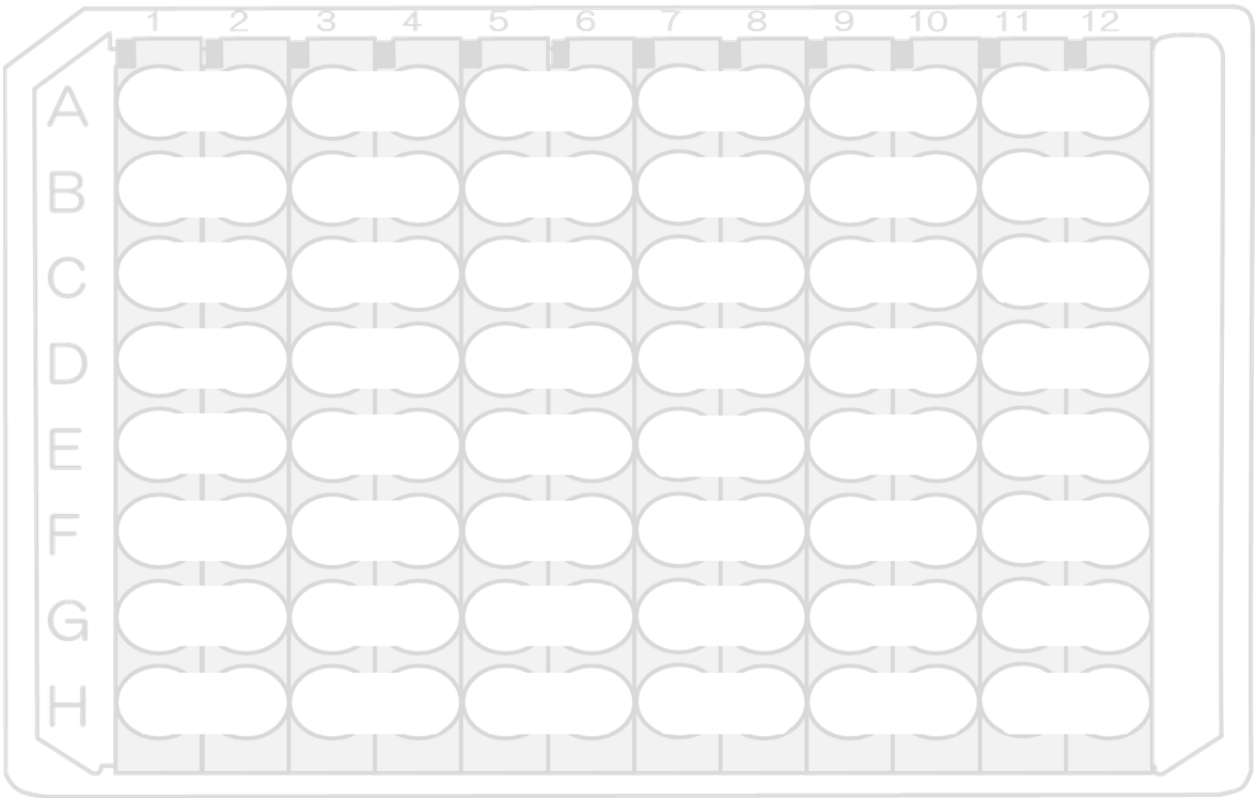
(* ③) 攪拌終了後プレートシールを貼り静置してください。

プレートシールは保護紙を剥がして、粘着面をプレート側にして貼り付けてください。一度使用したプレートシールは再使用しないでください。

(* ④) ピペッティングに関する注意事項は 「ピペッティング」 の動画をご参照ください。



レビス® Human VEGF ELISA Kit (AKH-VEGF)



【測定名】	
【所属】	
【測定者】	【測定日】
【ロット番号】	【有効期限】
【備考】	

【製品名】	レビス® Human VEGF ELISA Kit		
【シバヤギコード】	AKH-VEGF	【和光コード】	631-40831
【英語表記】	LBIS Human VEGF ELISA Kit (AKH-VEGF, FUJIFILM Wako Shibayagi, Gunma, Japan)		
【お問い合わせ先】			

製造	富士フイルムワコーシバヤギ株式会社 〒377-0007 群馬県渋川市石原 1062-1 TEL.0279-25-0279 FAX.0279-23-0313 <E-mail>wksb-info@fujifilm.com <URL>http://www.shibayagi.co.jp		
販売	富士フイルム 和光純薬株式会社		